

MICOTOX LTDA



DETERMINACION DE TRICOTICENOS TIPO A (T-2 toxina, DAS, HT-2 toxina y neosolaniol) EN CEREALES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC) DE FASE NORMAL (detección visible)

EXTRACCION Y CLARIFICACION

1. Pesar 25 g de muestra molida en un vaso de licuadora de vidrio de 250 mL o en un Erlenmeyer de 250 mL con tapa rosca.
2. Añadir 100 mL de acetonitrilo-agua, 84+16.
3. Homogenizar a alta velocidad durante 2 minutos (licuadora) o agitar vigorosamente durante una hora usando un agitador mecánico.
4. Filtrar a través de papel cualitativo rápido y transferir cerca de 10 mL del extracto filtrado a un tubo de ensayo de 15 x 85 mm.
5. Añadir 0.2 g de carbón activado, agitar en vórtex durante 1 minuto y dejar decantar durante 5-10 minutos.

PURIFICACION

6. Insertar el extremo con el tapón de caucho de un cartucho Micotox® M2007 en el tubo de ensayo y presionar hasta obtener 4 mL de solución purificada al interior del cartucho.
7. Transferir exactamente 4.0 mL del extracto purificado a un tubo de ensayo limpio y

evaporar a sequedad bajo nitrógeno o bajo vacío en un baño termostático a 60°C.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

8. Disolver el residuo seco con 100 µL de tolueno-acetonitrilo, 95+5 (agregar el solvente, tapar el tubo y agitar en vórtex durante 30 segundos).
9. Sembrar 40 µL de cada muestra junto con 10, 20, y 40 µL de estándar de trabajo en una cromatoplaaca de vidrio de silicagel 60 de 10 x 10 cm (sin indicador de fluorescencia).
La solución estándar de trabajo contiene 5 µg/mL de T-2 y de HT-2 toxina y 10 µg/mL de DAS y de neosolaniol en tolueno-acetonitrilo, 95+5 (disponible en Micotox Ltda.).
10. Desarrollar la placa con cloroformo hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire. NOTA: En este paso no hay desplazamiento de los analitos pero se eluyen interferencias y se mejora la sensibilidad del método.
11. Desarrollar la placa con tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (5+4+1) hasta 1 cm del borde superior. Dejar secar al aire.
12. Asperjar la cromatoplaaca con la solución reveladora Micotox*, dejarla secar al aire y calentarla a 110°C durante 5 a 15 minutos hasta que los analitos se hagan visibles como manchas púrpuras sobre un fondo lila claro.

*Disolver 1 g de reactivo revelador con 10 mL de agua. Mezclar una parte de esta solución con 5 partes de ácido sulfúrico-agua (5+3). El reactivo inicialmente es claro pero se oscurece con el tiempo. Preparar reactivo fresco cada 2 semanas.

Tricoticeño	Rf	Color
T-2 toxina	0.45	Púrpura
DAS	0.35	Púrpura
HT-2 toxina	0.20	Púrpura
Neosolaniol	0.15	Púrpura

CALCULOS

Se toman 25 g de muestra en 100 mL de solvente; del extracto se toman 4 mL que se llevan a sequedad y se redisuelven en 100 µL, de los cuales se siembran 40 µL. El equivalente en peso de la muestra sembrada es el siguiente:

25 g x 4/100 mL x 0.04/0.1 mL = 0.4 g en placa

$$\text{ng/g (ppb)} = \frac{\text{ng de toxina en la placa}}{0.4 \text{ g}}$$

Cantidad de estándar sembrado en placa (ng):

Vol. µl	T-2	DAS	HT-2	NEO
10	50	100	50	100
20	100	200	100	200
40	200	400	200	400

Equivalente en ppb del estándar de tricoticenos sembrado en placa (ng/g):

Vol. µl	T-2	DAS	HT-2	NEO
10	125	250	125	250
20	250	500	250	500
40	500	1000	500	1000

Límites de detección: <250 ppb de T-2 y HT-2 toxinas, <500 ppb de DAS y neosolaniol.

Límites de cuantificación: 250 ppb de T-2 y HT-2 toxinas, 500 ppb de DAS y neosolaniol.

TRICOTICENOS TIPO A TLC - FASE NORMAL/VISIBLE